

T細胞の胸腺分化におけるHrsの関与

著者	鈴木 信
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第16838号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00096839

博士論文

T 細胞の胸腺分化における Hrs の関与

東北大学大学院医学系研究科医科学専攻

発生・発達医学講座 小児病態学分野

鈴木 信

要約

小胞輸送とは、細胞膜からのエンドサイトーシスにおける蛋白質輸送、及び、小胞体、ゴルジ体、エンドソーム、リソソームなどのオルガネラ間の輸送の総称である。小胞輸送は細胞の維持に必須であるほか、生体の機能を様々に調節する。エンドサイトーシスによって初期エンドソームに取り込まれた膜蛋白質のうち、一部のユビキチン化蛋白質などは、エンドソーム膜上において ESCRT (Endosomal sorting complex required for transport)-0 複合体に認識され、その後、リソソームと融合し、分解される。

Hrs (Hepatocyte growth factor regulated tyrosine kinase substrate)は、細胞内小胞輸送の初期に関与する ESCRT-0 を構成する蛋白質の一つであるが、これまでに、T細胞の維持に重要な IL-2R や、細胞内シグナルに関与する gp130 などに結合することが知られている。しかしながら、Hrs のコンベンショナルノックアウトマウスは胎生致死となるため、T細胞における Hrs の生理学的な機能については知られていなかった。

本研究では、Cre-loxp システムを用いて T細胞特異的に Hrs を欠損するマウスを作製し、胸腺および脾臓において T細胞が著明に減少することを示した。一方で、Hrs-cKO 胸腺細胞は、in vivo での BrdU 投与において野生型と同様の取り込みを示し、Hrs は細胞増殖には必須では無いことが示された。

胸腺細胞は、正・負の選択の際に、プログラムされた細胞死、すなわちアポトーシスを起こすが、Hrs はこのセレクションの過程に関与している可能性が考えられた。

胸腺細胞が正の選択を受けず細胞死を起こすのは、主に、TCR の MHC への結合が十分でない場合が多い。しかし、Hrs-cKO 胸腺細胞は SP4 細胞へ成熟するにつれ、TCR β の発現レベルが亢進し、正の選択を受けていることを示唆した。また、一方、過度の TCR 刺激も負の選択によるアポトーシスを起こすため、Hrs の負の選択への関与については、解明の余地がある。

In vitro の培養では、Hrs-cKO 胸腺細胞は、野生型に比べアポトーシスが急速に進んでいることが示された。これらの結果から、T 細胞分化における Hrs の役割、胸腺の細胞死を制御する ESCRT-0 複合体の重要性が示された。

アポトーシスを起こした Hrs-cKO 胸腺細胞では、Caspase8 の高い活性を示すことがわかり、このアポトーシスの機序を解明することとした。まず、Hrs がポリユビキチン蛋白の認識・分解に関与していることから、Hrs 欠損状態では異常な蛋白蓄積による小胞体ストレスからのアポトーシスが起きている可能性を考えたが、野生型マウスとの差は認められなかった。また、Caspase8 は FAS, DR5, TNFR typ 1 などのデスリガンド受容体刺激によっても活性化されるが、これらの発現レベルも野生型との差は認められなかった。

Hrs-cKO 胸腺細胞における Caspase8 の活性化の機序を明らかにすることは、免疫不全や腫瘍性増殖の診断・治療へと繋がる可能性があり、今後の課題である。

目次

第 1 章 研究背景	1
第 2 章 研究目的	4
第 3 章 研究方法	5
3.1 実験動物	5
3.2 組織からの細胞単離	6
3.3 胸腺及び脾細胞の各分画の精製	6
3.4 定量的 RT-PCR	6
3.5 ゲノム DNA の精製及び PCR による Hrs 欠損の確認	7
3.6 フローサイトメトリー	
3.6.1 抗体	7
3.6.2 細胞解析	8
3.7 細胞数計測	9
3.8 胸腺組織像	9
3.9 細胞増殖反応	10
3.10 in vivo での BrdU 取り込み反応	10
3.11 細胞生存率の評価	10
3.12 ウェスタンブロット法	11
3.13 活性型 Caspase8 の評価	11
3.14 統計処理	11

第 4 章 研究結果	12
4.1 胸腺 T 細胞における Hrs の発現	12
4.2 T 細胞特異的な Hrs の欠損	12
4.3 Hrs 欠損による脾細胞の変化	13
4.4 胸腺の肉眼所見及び組織所見	13
4.5 胸腺細胞の減少	13
4.6 <i>in vitro</i> における増殖反	14
4.7 <i>in vitro</i> での胸腺細胞の生存率の変化	14
4.8 胸腺細胞の分化・生存に関与する表面マーカーの解析	14
4.9 <i>ex vivo</i> での胸腺 T 細胞の生存率の変化	15
4.10 Hrs 欠損細胞における Caspase の亢進	15
第 5 章 考察	17
第 6 章 結語	22
謝辞	23
引用文献	24
図の説明	27

1 章 研究背景

小胞輸送は、細胞膜からのエンドサイトーシスにおけるタンパク質輸送、及び、小胞体、ゴルジ体、エンドソーム、リソソームなどのオルガネラ間の輸送の総称である。小胞輸送は細胞の恒常性維持に必須であるほか、生体の機能を様々に調節し、その破綻は種々の疾患の病態形成に密接に関与する。エンドサイトーシスによって初期エンドソームに取り込まれた細胞膜蛋白質のうち、低密度リポ蛋白質受容体やトランスフェリン受容体のようにユビキチン化されない膜タンパク質はリサイクリング経路を経由して細胞膜へと戻される。一方、リガンド刺激依存的にユビキチン化される上皮成長因子受容体や gp130 のような膜タンパク質は、エンドソーム膜上においてそのユビキチン化部位を ESCRT (Endosomal sorting complex required for transport)-0 複合体に認識され、その後、順次 ESCRT-I 複合体、ESCRT-II 複合体、ESCRT-III 複合体に受け渡され、リソソーム内に送り込まれて分解される^(1,2,3,4,22) (図 1)。

Hepatocyte growth factor regulated tyrosine kinase substrate (Hrs) は、当初、Hepatocyte growth factor 刺激や IL-2 刺激により細胞内でチロシンリン酸化を受けるタンパク質として、本研究室などで同定されたが⁽⁶⁾、その後、ショウジョウバエなどの研究から、Endosomal sorting complex required for transport-0 (ESCRT-0) の必須の構成分子であることが明らかになった。Hrs は Signal transducing adaptor molecule (STAM1 あるいはSTAM2) と複合体を形成することにより

ESCRT-0 を構築し、ユビキチン化された膜タンパク質を認識し、ESCRT-I へ受け渡すことにより、ユビキチン化タンパク質のリソソーム依存的な分解に関与する^(2,4) (図 1) Hrs は 2 か所のユビキチン結合部位 (Ubiquitin interaction motif) や FYVE ドメインを有し^(5,6)、これらを介して、ポリユビキチン化、特にユビキチン分子内の 63 位リジンでポリユビキチン化されたタンパク質へ高い親和性を示す。^(2,4)

当研究室ではこれまでに、Hrs 欠損マウス胚由来のマウス胚繊維芽細胞において、上皮成長因子受容体や gp130 などの分解が著しく障害されること^(7,8,9)、Hrs 欠損による gp130 の分解遅延が IL-6 シグナルの遷延化を引き起こすことを示した。⁽⁹⁾ しかし、Hrs を全身で欠損したマウスは胎生致死に至ることから⁽¹⁰⁾、Hrs の生理的な役割を解明するため、Cre-loxP システムを用いてコンディショナルノックアウトマウスを作製した⁽¹¹⁾。ニューロン特異的 (*Syn I-Cre*) に Hrs を欠損したマウスでは脳神経系の発生異常と海馬の錐体ニューロンの細胞死の増加が認められた⁽¹²⁾。血液系の細胞については、B 細胞特異的 (*Mb1-Cre*) に Hrs を欠損したマウスでは、骨髄における B 細胞の初期分化には異常が認められなかったものの、脾臓では transitional B 細胞及び marginal zone B 細胞が著減し、T 細胞依存性の抗体産生の減少が認められた⁽¹³⁾。また、食細胞特異的 (*LysM-Cre*) に Hrs を欠損したマウス由来の Hrs 欠損樹状細胞では、エキソソーム分泌が抑制されたが、樹状細胞自身の分化や抗原提示能には異常が認められなかった⁽¹⁴⁾。これらの結果から、Hrs は、免疫グロブリンやエキソソームなど、ある種のタンパク質の分泌に関与する可能性が示唆された。T 細胞の ESCRT-

0 の役割については、STAM1 及び STAM2 を T 細胞特異的にダブルノックアウトしたマウスが胸腺細胞数の減少や末梢成熟 T 細胞の減少を呈することが知られている⁽¹⁵⁾。また、ESCRT-0 複合体に結合し脱ユビキチン化に働く USP8 が IL7 受容体のアップレギュレーションを介して T 細胞の成熟に重要な役割をはたしていることが、最近になって別のグループから示された⁽¹⁶⁾。以上のように、ESCRT-0 複合体が胸腺 T 細胞の分化に深く関与することが強く示唆されているが、その分子機構は不明なままである。

アポトーシスは胸腺 T 細胞分化において重要な行程であり、98%以上の胸腺細胞がアポトーシスによって細胞死に至る。アポトーシスは正の選択及び負の選択の両過程の中で生じるが、これらの選択機構は T 細胞受容体 (TCR) シグナルによって制御される。また、IL-7 も、アポトーシスを抑制することによって、胸腺 T 細胞の分化に関与している。胸腺のアポトーシスには少なくとも 3 種類の分子機構が関与していると考えられている。つまり、TCR 刺激依存的アポトーシス、デスリガンド刺激依存的アポトーシス及びグルココルチコイド依存的アポトーシスである。Caspase 8 はこれら 3 つの全てに関与しており、胸腺のアポトーシス制御に重要なプロテアーゼであると考えられている^(17,18)。

T 細胞における ESCRT-0 複合体の重要性が明らかにされつつあり、その生理学的な機能についての解明が待たれている。このため、本研究では T 細胞特異的 (*Lck-Cre*) に *Hrs* を欠損したマウス (以下、*Hrs-cKO*) を作製し、解析を行うこととした。

第2章 研究目的

本研究では、獲得免疫に必須である T 細胞の分化に、小胞輸送関連タンパク質 Hrs が関与していること、並びにその機序を明らかにすることを目的とした。

第3章 研究方法

3.1 :実験動物

Hrs のコンベンショナルノックアウトマウスは胎生致死となることから⁽¹⁰⁾、T細胞特異的に *Hrs* を欠損するコンディショナルノックアウトマウスを作製した。マウスは *Hrs*^{flox/flox} マウス (C57BL/6 背景)⁽¹¹⁾と *Lck-Cre Tg* マウス (C57BL/6 背景)⁽¹⁹⁾を交配し、得られた *Hrs*^{flox/+}・*Lck-Cre Tg* マウスをさらに *Hrs*^{flox/flox} マウスと掛け合わせるにより *Hrs*^{flox/flox}・*Lck-Cre Tg* (以下、*Hrs*-cKO) マウス及び *Hrs*^{flox/flox} マウス (以下、野生型) マウスを得た。この *Hrs*-cKO マウスにおいては、*Lck* 発現細胞においてのみ、*Cre* リコンビナーゼが発現し、*Hrs* 遺伝子が部分的に欠損するため、T細胞特異的な *Hrs* 欠損マウスとなる。このマウスの表現型としては、小柄で、脾腫を呈する個体が多い傾向にあった。野生型及び *Hrs*-cKOの確認は、尾から得られたDNAについて PCR で遺伝子型を調べることによって行った。マウスは東北大学大学院医学系研究科附属動物実験施設の SPF 環境下で飼育し、実験は東北大学動物実験安全専門委員会の承認のもとで実施した (2015 医動-113)。

3.2: 組織からの細胞単離

マウスからの組織の採取及び細胞単離は以下の方法によって行った。安楽死させたマウスから心臓、脳、肝臓、胸腺及び脾臓を採取し、予め medium を入れておいた 6 cm dish 内のステンレスメッシュ上に置き、2.5ml の注射器の内筒を用いてすり潰し、次いで 60 μ m 径のナイロンメッシュで濾して細胞懸濁液を調整した。

3.3: 胸腺及び脾細胞の各分画の精製

RNA 精製、ゲノム DNA 精製の際の胸腺の各分画及び脾臓 T 細胞、B 細胞の精製には、FACS AriaII セルソーター (BD Biosciences 社、San Jose, USA) を用いた。すなわち、胸腺からは CD4⁻CD8⁻ double-negative (DN)、CD4⁺CD8⁺ double-positive (DP)、CD4⁺ single-positive (SP4) 及び CD8⁺ single-positive (SP8) 細胞を精製、また、脾臓からは CD19 陽性細胞 (B 細胞)、CD3 ϵ 陽性細胞 (T 細胞) を精製し、いずれの純度も 99% 以上であった。培養に用いた胸腺細胞については、SP4 細胞は上記と同様にして FACS AriaII セルソーターを用い、DP 細胞は AutoMACS (Miltenyi Biotech 社、Bergisch Gladbach、ドイツ) を用いて精製した。それぞれ純度は 99% 以上、及び 90% 以上であった。

3.4: 定量的 RT-PCR

RNA の抽出及び cDNA の合成は既報の方法に基づいて行った⁽¹⁵⁾。すなわち、RNA については、心臓、脳、肝臓、胸腺各分画及び脾臓 T 細胞、B 細胞を TRIzol (Thermo Fisher Scientific, USA) に可溶化し、次いでクロロホルム、イソプロピルア

ルコールを用いて精製した。得られた RNA に相補的な cDNA は、SuperScript Preamplification System (Thermo Fisher Scientific)を用いて合成し、これを 7500 Real-time PCR system (TaKaRa Bio、日本)を用いて増幅し、Hrs の mRNA の発現を β -actin mRNA量で標準化し算出した。用いたプライマーの配列は下記の通りである。Hrs は forwardが 5'-CCATCCCCAAGTTCGGCATT-3', reverseが 5'-CTCTGACTGTGATAGGGCCAG-3'、 β -actin は forward が 5'-CTGCCTGACGGCCAGG-3', reverseが 5'-GGAAAAGAGCCTCAGGGCAT-3'である。

3.5: ゲノム DNA の精製及び PCR による Hrs 欠損の確認

ゲノム DNA の抽出には QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen 社、Venlo、オランダ)を使用した。PCR のプライマーは、flox 配列が存在する、Hrs の exon 2 及び exon 4 を挟むように設計し、forward が 5'-TTGTTGAATGAGTAACAAGGGTGG-3', reverseが 5'-TGGATCCCATGAAATGGGAAACAGC-3'である。

3.6: フローサイトメトリー

3.6.1 抗体

フローサイトメトリーに用いた抗体は、FITC-conjugated CD3 ϵ (145-2C11), APC-conjugated B220 (RA3-6B2), Pacific blue-conjugated CD4 (RM4-5), APC-conjugated CD8 α (53-6.7), APC-conjugated CD95 (=FAS)(15A7), PE-conjugated CD120 α (=TNFRtype1)(55R-286), APC-conjugated CD127(=IL7R) (SB/199), PE-conjugated CD262(=DR5) (MD5-1), FITC-conjugated TCR β (H57-597), Pacific blue-

conjugated TCR $\alpha\beta$, FITC-conjugated TCR $\gamma\delta$ (GL3), FITC-conjugated annexin V, PE-conjugated Streptavidin, APC-conjugated BrdU であり、TCR $\alpha\beta$ 抗体が invitrogen 社、CD262 抗体が Life technology 社、BrdU 抗体が eBioscience 社、その他は Biolegend 社から購入した。

3.6.2 細胞解析

フローサイトメトリー解析にあたって、脾臓、胸腺の細胞を単離したのち、既報の方法に基づいて行った。^(13,20) すなわち、CD16/32 抗体に氷上 10 分間反応させることによって Fc 受容体への非特異的な結合をブロックし、次いで各種抗体を氷上 15 分間反応させた。Biotin 標識の抗体については、抗体で氷上 10 分間反応させたのちに洗浄し、PE-conjugated Streptavidinを氷上 10 分間反応させた。調整した細胞は FACS CantoII フローサイトメーター (BD Biosciences 社) で測定し、FACS Diva ソフトウェア及び FlowJo ソフトウェア (Tree star)で解析した。

脾細胞については、CD3 ϵ ,B220 で染色し、CD3 ϵ 陽性細胞についてはさらに CD44 及び CD62L、または TCR $\alpha\beta$ 及び TCR $\gamma\delta$ の発現を比較した。

AnnexinV 及び Caspase8 の実験以外においては、胸腺細胞は CD4 及び CD8a 抗体で染色し、SP4 細胞及び DP 細胞にゲートしたうえで、それぞれの分画の CD3 ϵ ,TCR β ,CD127, Fas, DR5, TNFRtype1 の発現をヒストグラムで比較した。また、CCR7 及び TCR β と CD69 の展開については SP 4 細胞にゲートして解析した。Bcl-2 については、CD4 及び CD8a 抗体で染色後に、2%PFA で固定し、Bcl-2 抗体で細胞内

染色を行った。フローサイトメトリーで SP4 及び DP 細胞にゲートをかけたうえで、それぞれの分画における Bcl-2 の発現をヒストグラムで比較した。また、細胞内染色を行わないものについては、propidium iodide 陰性のものにゲートしたうえで解析した。

3.7:細胞数計測

脾臓の全細胞数については、前述 (3.2) の方法で得られた細胞懸濁液とトリパンブルー溶液を混合後、血球計算盤を用い顕微鏡下にトリパンブルー陰性細胞をカウントした。脾臓 B220 陽性細胞及び CD3ε 陽性細胞の数は、フローサイトメトリーで得られた B220 陽性細胞及び CD3ε 陽性細胞の各分画の割合に全細胞数をかけて得た。

同様にして胸腺の全細胞数を得たのち、フローサイトメトリーで CD4⁻CD8⁻ double-negative (DN)、CD4⁺CD8⁺ double-positive (DP)、CD4⁺ single-positive (SP4) 及び CD8⁺ single-positive (SP8) 胸腺細胞の各分画の割合を出し、全細胞数をかけて分画毎の細胞数を得た。

3.8 :胸腺組織像

胸腺を採取後速やかに 10%ホルマリン用液に入れ、24 時間固定後、パラフィンブロック切片を作製。ヘマトキシリン・エオジンにて染色をした。

3.9:細胞増殖反応

単離した SP4 細胞 (1×10^4 個/well) を 96 穴丸底プレートで、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ インキュベーターにて培養した。TCR 刺激は、培養プレートを抗 CD3 ϵ 抗体 ($1 \mu\text{g/ml}$) で 4°C で一晩 pre-coat し、そのプレートに細胞を添加し培養した。あるいは、さらに、抗 CD28 刺激抗体(37.51)を $1 \mu\text{g/ml}$ の濃度となるように添加し培養した。あるいは、phorbol myristate acetate は 10 ng/ml と Ionomycin は 250 ng/ml となるように添加した。培養開始から 66 時間後に $1 \mu\text{Ci}$ の ^3H -チミジンを取り込ませ、さらに 6 時間後に MicroPlate2 プレートカウンター (PerkinElmer) で解析した。

3.10: in vivo での BrdU 取り込み反応

BrdU 1 mg を PBS $100 \mu\text{l}$ に懸濁したものをマウスの腹くう内投与し、1 時間後に胸腺を採取した。細胞表面を CD4, CD8a で染色し、ついで BrdU 抗体及び 7-AAD で細胞内染色を行い、フローサイトメトリーで解析した。

3.11:細胞生存率の評価

胸腺の DP 細胞及び CD4 SP 細胞を単離したのち、96 穴丸底プレートを用い 1×10^4 個/well で 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ インキュベーターにて培養した。フローサイトメトリーで Annexin V 及び Propidium iodide を用いて染色し、Annexin V と Propidium iodide の両者に陰性の細胞を生存細胞と定義し、その数を測定した。

3.12: ウェスタンブロット法

ウェスタンブロットは、以下の方法で行った。すなわち、マウス胸腺細胞を単離したのち、1%NP-40 lysis buffer (1%Nonidet P-40, 40 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride, 20 mEq/ml Aprotinin)で溶解したのち、不溶分画を遠心分離にて除去し、抽出タンパク質を定量後に Lithium Dodecyl Sulfate sample buffer と混合し 70°C、15 分間加温し安定化した。その後、硫酸ドデシルナトリウム—ポリアクリルアミドゲル電気泳動（以下、SDS-PAGE）で分離し、PVDF 膜 (Millipore) に転写後、blocking reagent (TOYOBO) でブロッキングを行い、1 次抗体を 4°Cで一晩反応させ、HR-POD 標識 2 次抗体を室温で 1 時間反応させ、VersaDoc (Bio-Rad)で発光を検出した。

3.13: 活性型 8 の評価

胸腺のDP細胞及びCD4 SP細胞を精製したのち、96 穴丸底プレートを用い 1×10^4 個 /well で 37°C、5%CO₂ インキュベーターにて培養した。解析の最後の 1 時間にIETD-FMK-FITCを添加し、活性型Caspase8 をフローサイトメトリーで解析した。この試薬はCaspase8 が活性化した際に認められる特異的なアミノ酸配列であるIETDに不可逆的に結合し、FITCで標識されていることにより、フローサイトメトリーで発現を評価できるものである。

3.14: 統計処理

データは平均値±標準偏差で表記し、統計処理は Students *t* test を用いて行い、統計学的有意差は *p* 値<0.05 (*) ,*p*<0.005(**)と定義した。

第4章 研究結果

4.1: 胸腺 T 細胞における Hrs の発現

胸腺 T 細胞での Hrs の発現を確認するため、心臓、脳、肝臓、胸腺の各分画及び脾臓の T 細胞、B 細胞について Hrs の mRNA の発現を半定量的 RT-PCR 法で調べた。その結果、非血液系の組織に比べて低いものの、Hrs は胸腺細胞の全てのサブポピュレーションで発現しており、また、末梢の成熟 T 細胞と同程度の発現を示すことを確認した (図 2A)。

4.2 T 細胞特異的な Hrs の欠損

Hrs-cKO マウスにおいては、Lck 発現細胞においてのみ、Cre リコンビナーゼが発現し、Hrs 遺伝子が部分的に欠損するため、T 細胞特異的な Hrs 欠損マウスとなる。

これを確認するために、野生型マウス及び Hrs-cKO マウスから、脳及び胸腺の各サブポピュレーションを採取し、Hrs の欠損を調べた。Hrs-cKO マウスでは、Lck が発現しない組織である脳においては、野生型マウスと同様の 2.3 kb のサイズのパンドのみが見られるのに対し、胸腺 DN 細胞では 0.3 kb 及び 2.3 kb の 2 つのサイズのパンドが見られ、DP 以降の細胞では 0.3 kb のサイズのパンドのみとなり、Hrs が欠損していることが確認された。(図 2B)

4.3 Hrs 欠損による脾細胞の変化

Hrs-cKOマウスでは野生型マウスに比べ脾腫を呈するものが多く認められたが、脾細胞をフローサイトメトリーで解析したところ、Hrs-cKO マウスでは T 細胞の数が著しく減少していた。(図 3A,B) また、残存している T 細胞では大部分が CD44^{high}CD62L^{low} のエフェクター記憶細胞の表現型を示し、また、 $\gamma\delta$ 現細胞の割合が増加していた。これらのことから、Hrs-cKO マウスにおいては、末梢 T 細胞は量的にも質的にも野生型マウスと大きく異なることが示された (図 3 C,D)

4.4 胸腺の肉眼所見及び組織所見

野生型マウスに比べ Hrs-cKO マウスの胸腺は小さく(図 4A)、組織像では胸腺皮質の菲薄化が認められる一方、髄質は保たれていた。また、高倍率の組織像では核及び核小体の染色が不均一であった。(図 4B)

4.5 胸腺細胞の減少

胸腺の総細胞数は Hrs-cKO マウスで半数程度まで減少し (図 4 C)、フローサイトメトリーによる解析から、CD4 SP 胸腺細胞及び DP 胸腺細胞の割合の低下が認められた (図 4 D)。胸腺の総細胞数が顕著に減少しているため、各分画の細胞数においては DP 細胞以降で有意に減少していた (図 4 E)。

4.6 *in vitro*における増殖反応

次に、細胞数の減少について、胸腺細胞の刺激への反応性の観点から検討するため、*in vitro*で同細胞を TCR 刺激もしくは PMA/Ionomycin 刺激し、増殖反応を解析した。その結果、いずれの刺激においても Hrs-cKO SP4 細胞では増殖反応の低下が示唆された。(図 5A)

4.7 *in vivo*での増殖反応

一方、*in vivo*における増殖反応を評価したところ、胸腺細胞をフローサイトメトリーで解析したところ、細胞周期における DNA 合成期から細胞分裂期の細胞を示す S 期、G2 期及び M 期の各ステージの割合は、Hrs-cKO マウスと野生型マウスで差は認められなかった。(図 5 B)

4.8 胸腺細胞の分化・生存に関与する表面マーカーの解析

また、胸腺細胞の分化・生存に関与する細胞表面マーカーである、CD3ε、TCRβ、CD127 (IL7 受容体 α 鎖) の発現レベルをフローサイトメトリーにて解析し、Hrs-cKO マウスと野生型マウスで比較した。その結果、これらの分子の発現は、SP4 細胞では明らかな差は認められなかった。一方、DP 細胞では、低いレベルではあるものの Hrs-cKO マウスにおいて TCRβ,CD3ε の発現が野生型マウスに比べ上昇していた (図 5 C)。さらに、SP4 細胞における成熟を示す CCR7 や TCRβ と CD69 の発現パターンについても、Hrs-cKO マウスは野生型マウスと同様の成熟パターンを示した (図 5

D,E)。以上の結果は Hrs-cKO 胸腺 T 細胞が胸腺内で TCR 刺激へ反応したことを示唆するものと考えられた。

4.9 *ex vivo* での胸腺 T 細胞の生存率の変化

Hrs-cKO マウスにおいては、*in vivo* では増殖能に問題がないにも関わらず、胸腺細胞数が減少していることから、細胞死が亢進している可能性を考え、アポトーシスについて評価することとした。

Hrs-cKO マウス及び野生型マウスの SP4 細胞および DP 細胞のそれぞれについて解析した結果、Hrs-cKO マウスの細胞では野生型マウスに比べ、いずれの分画においても生存率の低下が認められた。(図 6A,6B)

4.10 Hrs 欠損細胞における Caspase の亢進

アポトーシスの原因として、蓄積したユビキチン化タンパク質によるものである可能性も考え、ウェスタンブロット法により胸腺細胞内のユビキチン化タンパク量を比較したが、両マウス間での差は認められなかった (図 7A)。

また、抗アポトーシス蛋白である Bcl-2 についてフローサイトメトリーで発現量を比較したが、こちらも両マウス間で明らかな差は認められなかった。(図 7B)

次に、プロアポトーシス蛋白である Caspase 8 の活性化を *ex vivo* 培養系で評価した。その結果、Hrs-cKO 胸腺 T 細胞では野生型 T 細胞に比し、活性型 Caspase 8 陽性細胞の比率が高く、その比率は、生存率 (Annexin V 陰性率) (図 6A,B) と逆の相関を示した (図 7C,D)。

最後に、T 細胞に発現するデスリガンド受容体である Fas、DR5 および TNF Rtype1 の細胞表面発現量を解析したが、いずれも野生型と差は認められなかった（図 7 E）。

第5章 考察

本研究では、T 細胞特異的 Hrs 欠損マウス（以下、Hrs-cKO マウス）を作製することにより、胸腺 T 細胞における Hrs の重要性を明らかにした。Hrs-cKO 胸腺 T 細胞はアポトーシスによる細胞死をきたしやすく、増殖能を見た実験系において *in vitro* と *in vivo* では一見、乖離したかのような結果を示したが、これは *in vitro* の実験系ではアポトーシスの影響を反映しているためと考えられた。（図 5.A,B）

また、本研究ではこの細胞死が Caspase 8 の活性化に付随して起こることを見出し、Hrs が細胞死を抑制することで T 細胞の分化・生存に必要であることが示唆された。

Hrs-cKO マウスでは末梢の T 細胞が著しく減少し、また、残った T 細胞も通常とは異なる表現型を示した。末梢における $\gamma\delta$ T 細胞が保たれていることの原因として、 $\gamma\delta$ T 細胞は通常の T 細胞（ $\alpha\beta$ T 細胞）とは異なり、胸腺内で Lck 非依存的に分化し、末梢へ出るためと考えられた。（図 3.D）

これらのことから、Hrs-cKO マウスでの胸腺細胞の減少は、刺激への反応性の低下や細胞サイクルの異常よりも、細胞死が亢進によるものと考えられた。

実際に *in vitro* の培養において、Hrs-cKO マウスの胸腺細胞は、SP4 胸腺細胞・DP 胸腺細胞とも、野生型に比べて速やかにアポトーシス陽性となること、つまり細胞死を起こすことが示された。

Hrs 欠損 B 細胞では初期分化に影響が無いことに対して、本研究の Hrs-cKO マウスで胸腺及び成熟 T 細胞が減少することは、Hrs が T 細胞に特有の機構に関与している可能性を示唆するものと考えられた。つまり、T 細胞は胸腺での正と負の選択によるプログラムされた細胞死（アポトーシス）の過程を経て成熟・分化を遂げることから、Hrs が胸腺での正あるいは負の選択に関与している可能性が考えられた。胸腺 T 細胞が正の選択を受けず細胞死を起こすのは、主に、TCR の自己 MHC への結合が十分でないことに起因する。しかし、Hrs-cKO 胸腺細胞は前述の通り、SP4 細胞へ成熟するにつれ TCR β の発現レベルが亢進し、CCR7 の発現を野生型細胞と同程度に獲得したことから、Hrs は正の選択には必ずしも必須でないと考えられる (図 5.C,D)。

一方、負の選択による T 細胞死は、強い TCR 刺激によって惹起される。したがって、Hrs 欠損によって TCR シグナルが増強され負の選択が促進された可能性が考えられる。Hrs-cKO マウスの DP 胸腺細胞において CD3 ϵ ,TCR β の発現が野生型に比べ亢進していることは、これを示唆するものと考えられた。(図 5.C)

しかし、この仮説を実証するためには、TCR 遺伝子導入マウスなどの抗原特異的な胸腺細胞分化を解析する実験系を使用する必要がある、負の選択についての解析までは至らなかった。

本研究では、別の観点から引き続きアポトーシスの原因の精査を進めた。まず、Hrs がユビキチン化膜タンパクの分解に働くことから、Hrs-cKO マウスに見られるアポトーシスの原因として、異常蛋白の蓄積によるものを考えた。そこで、Hrs が特異的に認識する K63 ポリユビキチン化タンパクを評価したが、野生型マウスと Hrs-

cKO マウスで差が認められなかった。(図 7.A) しかし、今回の結果からは特定の K63 ユビキチン化蛋白の蓄積が胸腺細胞のアポトーシスを惹起している可能性は否定できない。

次に、アポトーシスの誘因となる Caspase について、Annexin-V の染色と同様のタイムコースで調べたところ、Annexin-V と正の相関を示す形で、Hrs-cKO マウスの胸腺細胞では、より多くの細胞において活性型 Caspase-8 が認められた。

Caspase-8 の活性化には、少なくとも 3 つの経路が知られている。つまり、デスリガンド受容体を介するもの、グルココルチコイド誘発性のもの、そして TCR 刺激によるものである。これらのいずれもが胸腺細胞で起こりうるため、まず、デスリガンド受容体の発現について評価したが、FAS, DR5, TNFRtype1 の発現レベルについては影響は認められなかった。しかし、本研究では受容体の発現レベルの評価に留まっており、その上流及び下流のシグナルへの影響については解析の余地がある。また、グルココルチコイドによる影響については、予備実験の段階ではあるが、*in vitro* でデキサメタゾンを追加してのアポトーシスや、この経路で発現が亢進するとされている Glucocorticoid-induced leucine zipper の mRNA 量には変化は認められなかった。TCR 刺激によるものについては、前述のとおり、Hrs が強い TCR 刺激による負の選択に関与する可能性が示唆された一方で、負の選択における Caspase8 の関与についての見解は定まっていない。強い TCR 刺激によるアポトーシスは DP 細胞と semimature な SP4 細胞 (=CD24^{high} SP4 細胞) の両者に見られる現象であることが知られているが、semimature な SP4 細胞のアポトーシスが Caspase 8 依存性

であると考えられているのに対し、DP細胞ではCaspase 8 非依存性と考えられている⁽¹⁷⁾。そのため、Hrs-cKOマウスのDP細胞においては、Hrsは通常の負の選択とは異なる機序に関与している可能性もあり、このことからHrsの負の選択への関与については精査の必要がある。

Hrs-cKO 胸腺で見られる T 細胞分化の障害は、既に報告されている T 細胞特異的 STAM1/2-cKO マウスや T 細胞特異的 USP8-cKO マウスで認められる T 細胞分化障害の表現型と類似していた。(表 1) STAM1/2 や USP8 は、Hrs 同様、ESCRT-0 機能に関与するタンパク質であることから、Hrs-cKO マウスから得られた知見は ESCRT-0 の T 細胞分化における重要性を裏付けられたものである。特に、Hrs-cKO マウスと STAM1/2-cKO の T 細胞分化障害の表現型は完全に一致しており、従来、STAM1 あるいは STAM2 と Hrs がタンパク複合体を形成することで ESCRT-0 が構成されるとされている *in vitro* での従来知見と良く合致する結果であった。それに対して、USP8-cKO マウスと Hrs-cKO マウスとではその表現型に異なる点が認められ、必ずしも両分子が同一の機構で作用しているとは限らないと考えられる。例えば、USP8-cKO マウスでは重篤な大腸炎を自然発症しマウスが短命であるが、Hrs-cKO マウスでは致死性の腸炎を発症する個体は稀であった。また、USP8-cKO 胸腺で見られる T 細胞分化障害の原因の一つとして IL-7 受容体の発現低下が指摘されているが、Hrs-cKO 胸腺細胞での IL-7 受容体の発現量は野生型と同程度であった。

さらに、本研究ではHrsの胸腺細胞における影響について着目したが、成熟T細胞におけるHrsの機能については不明である。Hrs-cKOマウスの末梢にわずかに見られる成熟T細胞は、大部分がCD44^{high}CD62L^{low}という表現型を示しており、これは恒常性維持性増殖による影響と考えられた。そのため、通常の成熟T細胞におけるHrsの機能について評価はできず、成熟後のT細胞へのHrsの影響の有無については今後の課題である。

本研究ではHrsが直接影響を与える蛋白の同定や、その下流の詳細の機序までは得られなかった。しかし、Hrsが胸腺細胞においてCaspase8を介するアポトーシスを抑制することで末梢におけるT細胞を維持していることがわかった。この機序を明らかにすることにより、現在、分類不能免疫不全とされている疾患におけるESCRT蛋白の関与を調べ、新規の診断・治療へ応用しうるものと考えられる。

第 6 章 結語

Hrs がアポトーシスを抑制することにより T 細胞の胸腺分化に寄与することを示し、ESCRT 機構の免疫系における新しい役割が明らかになった。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、医学系研究科共通機器管理室の山下恒雄様と同室病理プラットフォームの伊達文子様から多大なる技術的支援を頂きましたことを厚く御礼申し上げます。

引用文献

1. J.H. Hurley, :ESCRTs are everywhere. EMBO J 2015
2. N.Tanaka, M.Kyuuma, K.Sugamura :Endosomal sorting complex required for transport proteins in cancer pathogenesis, vesicular transport, and non-endosomal functions. Cancer Sci 2008; 99:1293-1303.
3. M.Babst, G.Odorizzi :The balance of protein expression and degradation: and ESCRTs point of view. Curr Opin Cell Biol 2013; 25: 489-494
4. X. Ren, J.H. Hurley :VHS domains of ESCRT-0 cooperate in high-avidity binding to polyubiquitinated cargo. EMBO J 2010; 1045-1054.
5. T.Takeshita,T.Arita,K.Sugamura et al :STAM, signal transducing adaptor molecule, is associated with Janus kinases and involved in signaling for cell growth and c-myc induction. Immunity 1997; 6:449-457
6. H.Asao, Y.Sasaki,K.Sugamura et al :Hrs is associated with STAM, a signal-transducing adaptor molecule. Its suppressive effect on cytokine-induced cell growth. J Biol Chem 1997; 272: 32785-32791.
7. C. Kanazawa, E. Morita, Sugamura et.al :Effects of deficiencies of STAMs and Hrs, mammalian class E Vps proteins, on receptor downregulation. Biochem Biophys Res Commun 2003; 309: 848-856.
8. M.Toyoshima,N.Tanaka,K.Sugamura et al :Inhibition of tumor growth and metastasis by depletion of vesicular sorting protein Hrs: its regulatory role on E-cadherin and beta-catenin. Cancer Res 2007; 67: 5162-5171.
9. Y.Tanaka, N.Tanaka,K.Sugamura et.al :c-Cbl-dependent monoubiquitination and lysosomal degradation of gp130. Mol Cell Biol 2008; 28: 4805-4818.

10. S.Miura,T.Takeshita,K.Sugamura et al :Hgs(Hrs), a FYVE domain protein, is involved in Smad signaling through cooperation with SARA. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 9346-9355
11. H.Kobayashi,N.Tanaka,K.Sugamura et al :Hrs, a mammalian master molecule in vesicular transport and protein sorting, suppresses the degradation of ESCRT proteins signal transducing adaptor molecule 1 and 2. *J Biol Chem* 2005; 280: 10468-10477.
12. K.Tamai,M.Toyoshima, K.Sugamura et al :Loss of hrs in the central nervous system causes accumulation of ubiquitinated proteins and neurodegeneration. *Am J Pathol* 2008; 173: 1806-1817.
13. T.Nagata,K.Murata,N.Ishii et al :Hepatocyte growth factor regulated tyrosine kinase substrate in the peripheral development and function of B-cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 443: 351-356.
14. K.Tamai,N.Tanaka,K.Sugamura et al :Exosome secretion of dendritic cells is regulated by Hrs, an ESCRT-0 protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 399: 384-390.
15. M.Yamada,N.Ishii,K.Sugamura et al :Signal-transducing adaptor molecules STAM1 and STAM2 are required for T-cell development and survival. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 8648-8658.
16. A.Dufner, A.Kisser,P.Knobeloch et al : The ubiquitin-specific protease USP8 is critical for the development and homeostasis of T cells. *Nat Immunol* 2015; 16: 950-960.
17. N.Pozzesi,A.Fierabracci, D.V.Delfino et al : Role of caspase-8 in thymus function. *Cell Death Differ* 2014; 21: 226-233.
18. S.Shalini, L.Dorstyn,S.Kumar et al :Old, new and emerging functions of caspases, *Cell Death Differ* 2015; 22: 526-539
19. Y.Takahama,K.Ohishi,J.Takeda et al : Functional competence of T cells in the absence of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins caused by T cell-specific disruption of the *Pig-a* gene. *Eur J Immunol* 1998; 28: 2159-2166.

20. H.Nagashima,Y.Okuyama,N.Ishi & T.So et al : The adaptor TRAF5 limits the differentiation of inflammatory CD4(+) T cells by antagonizing signaling via the receptor for IL-6. Nat Immunol 2014; 15: 449-456.
21. S.Taniichi,A.Shimba,K.Ikuta et.al:Interleukin-7 receptor controls development and maturation of late stages of thymocyte subpopulations. Proc Natl Acad Sci U S A 2013;110(2):612-7
22. Oliver Schmidt et al. :The ESCRT machinery, Current Biology, 2012 :116-120

図の説明

図 1

ESCRT 複合体の模式図

エンドソーム膜上に存在する ESCRT 経路全体の模式図及び拡大図を上段・中段で提示し、下段は ESCRT-0 複合体についての模式図及び機能について示した。

図 2

A : mRNA レベルでの Hrs の発現

8 週齢の C57BL/6 マウス 3 匹から採取した心臓、脳、肝臓、胸腺細胞の各分画および脾細胞をプールし、抽出した RNA から cDNA を合成し、qRT-PCR にて Hrs の発現量を判定量的に測定した。内因性コントロールとして β アクチンを使用し、得られた Δ CT 値について、脳を 1 として示す。

B : ゲノムレベルでの Hrs の欠損

Hrs^{flx/flx}マウス（以下、野生型と表記）及び *Hrs*^{flx/flx}・*Lck-Cre*マウス（以下、Hrs-cKO と表記）から脳と胸腺を採取し、さらに胸腺については図に示す分画をセルソーターで分取し、それぞれからゲノムDNAを抽出した。HrsのゲノムDNAについてPCRを行い、Hrsアリの部分欠損を確認した。2.3 kbのバンドが野生型アリスを、0.3 kbのバンドが変異アリスを示す。

図 3

A,B : 野生型マウス及び Hrs-cKO マウスの脾細胞の比較

4 週齢の野生型マウス及び Hrs-cKO マウスから脾細胞を単離し、フローサイトメトリ解析を行った。CD3 ϵ 陽性細胞、B220 陽性細胞の割合から各分画の細胞数を算出した。A には代表的なドットプロットデータを示す。B に全細胞数、B220 陽性 B 細胞数、CD3 ϵ 陽性 T 細胞数の平均値 \pm 標準偏差（各 n = 6）を示す。

C,D : 成熟 T 細胞における表現型の比較

脾細胞の中でCD3 ϵ 陽性細胞にゲートをかけた上で、CD44 とCD62Lで展開し、エフェクターメモリー細胞（CD44^{high}CD62L^{low}）及びナイーブ細胞

（CD44^{low}CD62L^{high}）の割合を測定した。代表例を示す。（図 3C）

また、脾細胞の中で CD3 ϵ 陽性細胞にゲートをかけた上で、TCR $\alpha\beta$ 陽性細胞及び TCR $\gamma\delta$ 陽性細胞の割合を測定した。代表例を示す。（図 3D）

図 4

A : 胸腺肉眼像の比較

4 週齢の野生型マウス胸腺及び Hrs-cKO マウス胸腺を並べて提示した。

B：胸腺組織像の比較

野生型マウス及び Hrs-cKO マウスの胸腺細胞を 10%ホルマリンで 24 時間固定し、パラフィン切片をヘマトキシリン-エオジンで染色した。10 倍及び 100 倍の拡大像を示す。

C：胸腺細胞数の比較

4 週齢の野生型マウス及び Hrs-cKO マウスの胸腺細胞を単離し、トリパンブルー非取り込み細胞をカウントした。それぞれの平均値±標準偏差（各 n = 8）を示す。

D,E：胸腺細胞各分画の比較

フローサイトメトリーにて CD4⁺CD8⁻ double-negative (DN)、CD4⁺CD8⁺ double-positive (DP)、CD4⁺ single-positive (SP4) 及び CD8⁺ single-positive (SP8) 細胞の割合を求め、各分画の細胞数を算出した。D に代表的なドットプロットデータを示す。E に各分画の細胞数平均値±標準偏差（各 n = 8）を示す。

図 5

A：³Hチミジンの取り込み試験

SP4 細胞をセルソーターで精製し、無刺激 (Medium)、CD3ε 抗体のみ (CD3)、抗 CD3ε + 抗 CD28 抗体 (CD3+28) あるいは PMA + Ionomycin (PMA/Iono) 存在下で 72 時間培養し、最後の 6 時間に ³Hチミジンを取りこませた。シンチレーションカウンタで計測した cpm 値の平均±標準偏差（各 n = 3）を示す。

B：in vivo BrdU 取り込み試験

マウス 1 匹あたり、PBS 200μl にけん濁した BrdU 1mg を i.p し、1 時間後に胸腺を採取して解析した。CD4, CD8a 抗体で染色し、次いで BrdU 抗体及び 7-AAD で細胞内染色を行い、フローサイトメトリーにて解析した。図は SP4 細胞にゲートをかけたもので、上部に代表的なドットプロットを示し、G0+G1 期、S 期、G2+M 期に相当する細胞を囲んだ。下部に各周期の割合の平均値±標準偏差(各 n=3)を示す。

C,D,E：胸腺細胞表面抗原の比較

野生型マウス及び Hrs-cKO マウスの胸腺細胞を CD4、CD8a 抗体で染色し、フローサイトメーターで図に示す各分画にゲートをかけ、TCRβ、CD3ε、CD127、CCR7 および CD69 の発現を解析した。代表例を図に示す。全てのデータについて、少なくとも 4 匹のマウスにおいて同様の結果が得られた。

図 6

A,B：SP4 胸腺細胞及び DP 胸腺細胞の生存率の比較

胸腺から SP4 細胞および DP 細胞をセルソーターで分取し、無刺激の状態で 37℃、5%CO₂ の環境で培養した。1 日後、2 日後に AnnexinV 及び propidium iodide で染色し、フローサイトメトリーにて解析した。AnnexinV 陰性かつ propidium iodide 陰

性の細胞を生細胞と定義し、生存率を計算した。Aにそれぞれの分画の生存率を示す（各 $n = 3$ ）。また、培養 1 日後の AnnexinV の染色例を B に示す。

図 7 :

A : ユビキチン化蛋白の比較

野生型マウス及び Hrs-cKO マウスの胸腺からタンパク質を抽出し、抗ユビキチン抗体及び抗 K63-ポリユビキチン抗体によるウェスタンブロット解析を行った。内因性対照として β -actin を用いた。結果を図に示す。グラフは野生型及び Hrs-cKO それぞれ 3 個体ずつ解析したものを Image J で数値化し平均値 \pm 標準偏差(各 $n=3$)を示す。

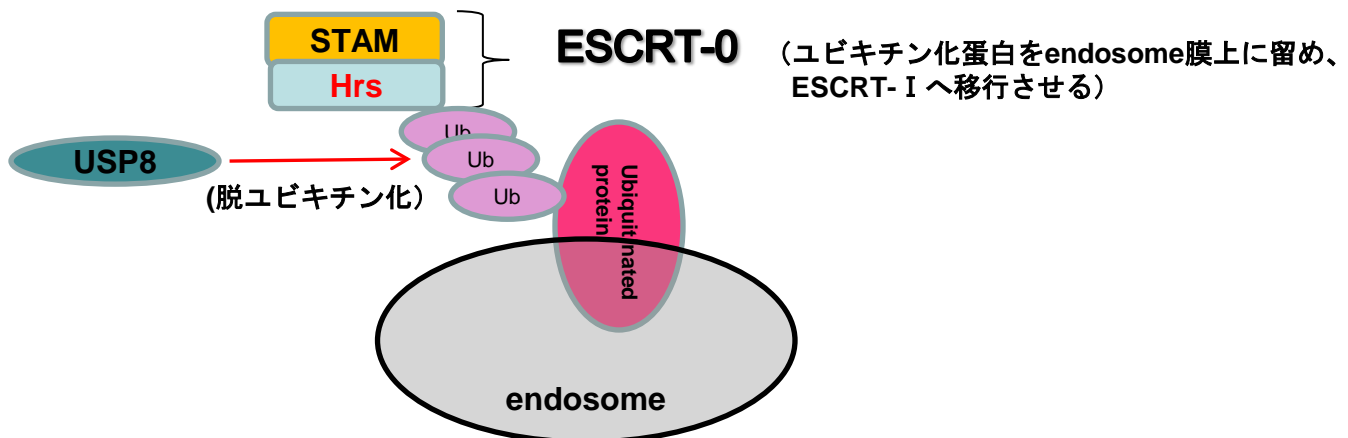
B: Bcl-2 発現の比較

胸腺細胞を CD4、CD8a 抗体、及び Bcl-2 抗体で染色し、フローサイトメトリーにて解析を行った。SP4 及び DP 細胞分画にゲートをかけたうえでの Bcl-2 の発現を示す。

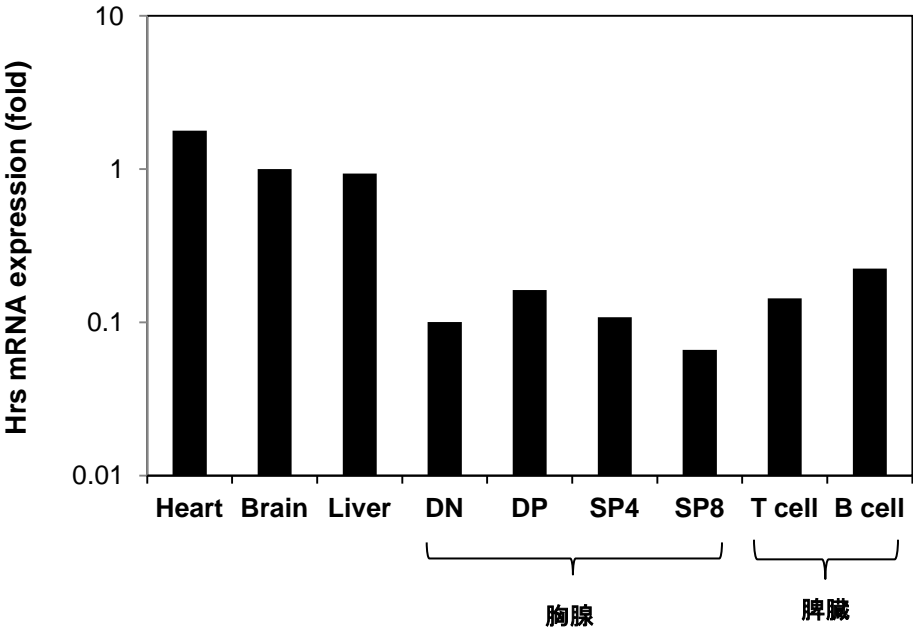
C,D : SP4 胸腺細胞及び DP 胸腺細胞の活性型 Caspase8 の比較

胸腺から SP4 細胞および DP 細胞をセルソーターで採取し、無刺激で培養した。1 日後、2 日後に FITC-IETD-FMK で 1 時間染色し、フローサイトメトリーにて解析した。B に活性型 Caspase8 (FITC 陽性) 比率の平均値 \pm 標準偏差（各 $n = 3$ ）を示す。C に培養 1 日後の活性型 Caspase8 染色例を示す。

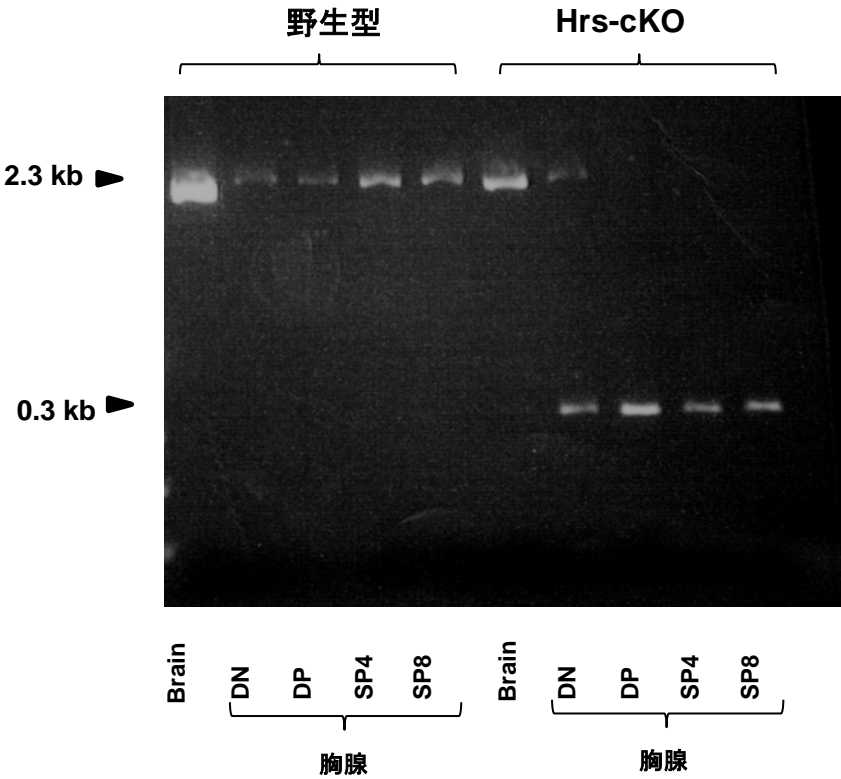
E : 胸腺細胞を CD4、CD8a、及び Fas、DR5、TNFRtype1 に対する抗体で染色した。フローサイトメトリーにて SP4、DP 分画にゲートした上で、Fas、DR5 および TNFRtype1 の発現を示す代表例を示す。少なくとも 4 匹ずつの比較において同一の結果が得られた。

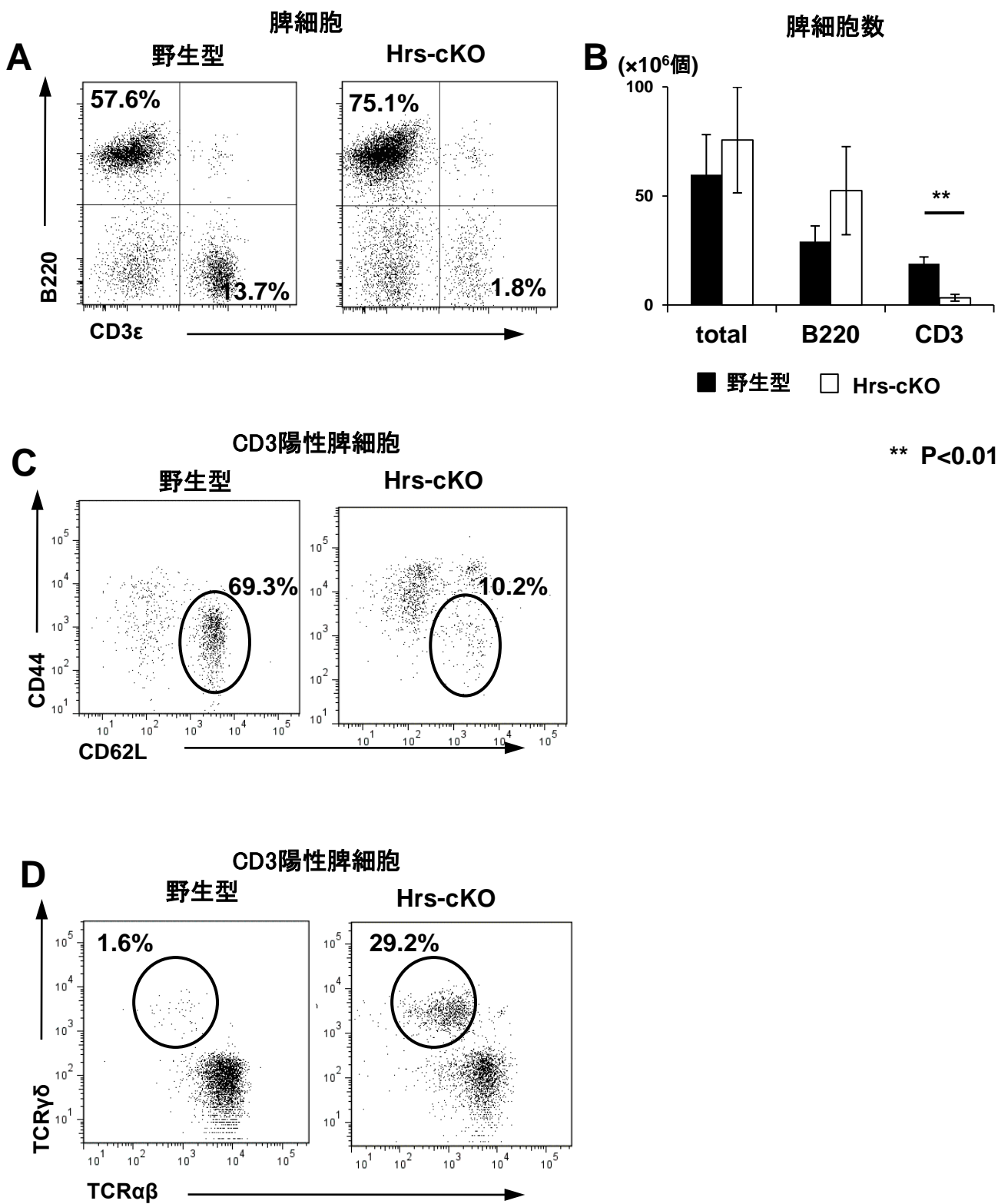


A



B





A 胸腺肉眼所見

野生型

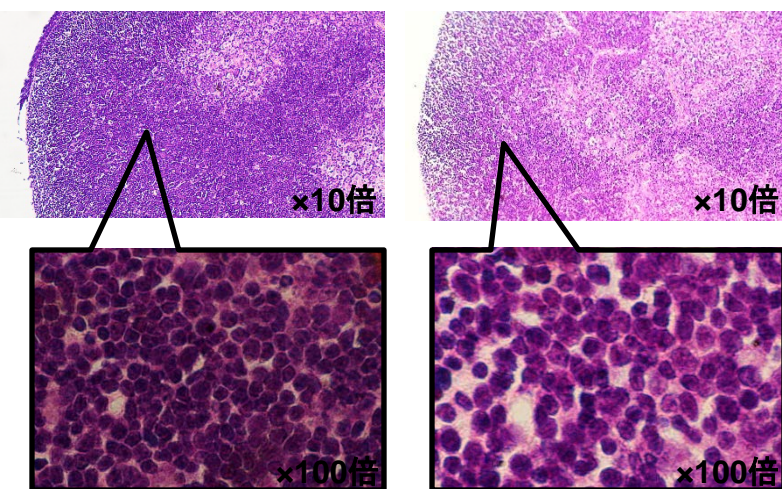
Hrs-cKO



B 胸腺組織像

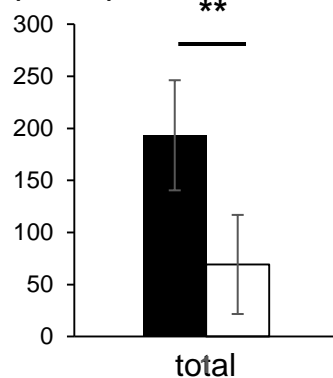
野生型

Hrs-cKO



C 胸腺細胞数

($\times 10^6$ 個)



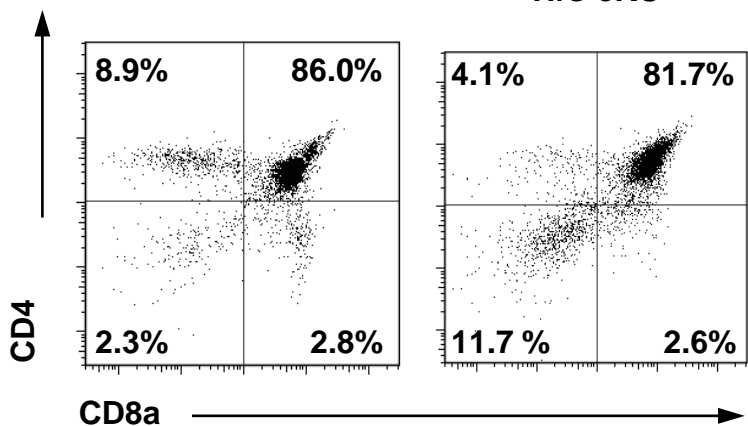
■ 野生型 □ Hrs-cKO

** $P < 0.01$

D 胸腺細胞

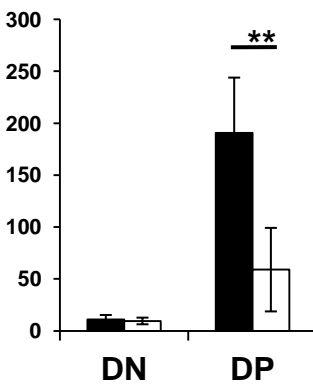
野生型

Hrs-cKO

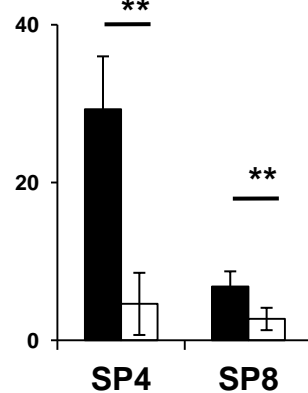


E 胸腺細胞数

($\times 10^6$ 個)



($\times 10^6$ 個)



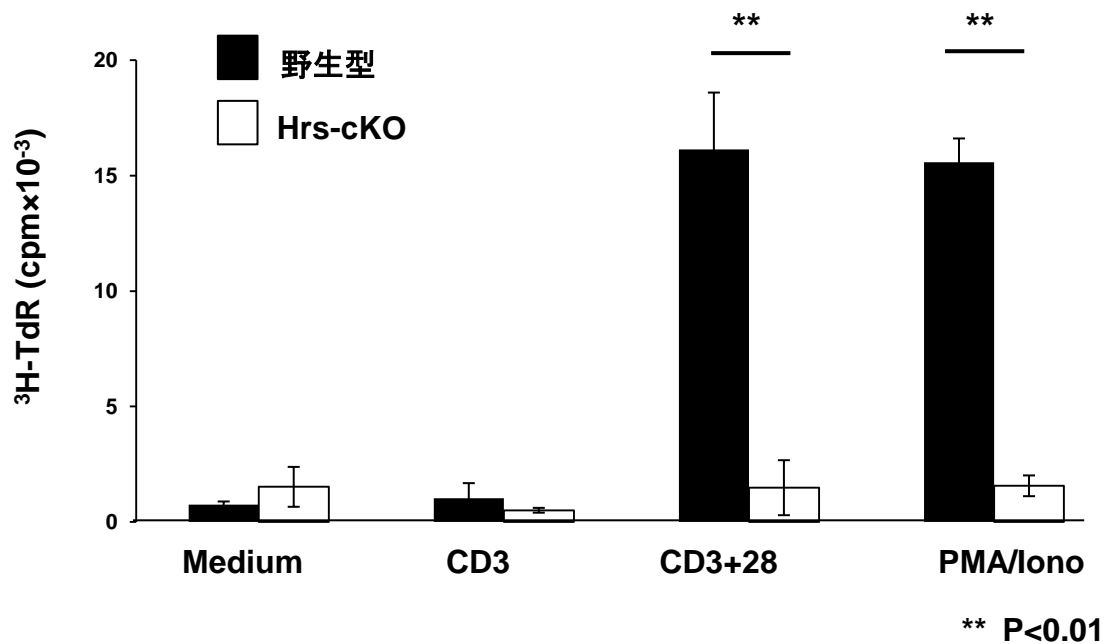
■ 野生型 □ Hrs-cKO

** $P < 0.01$

図5-1

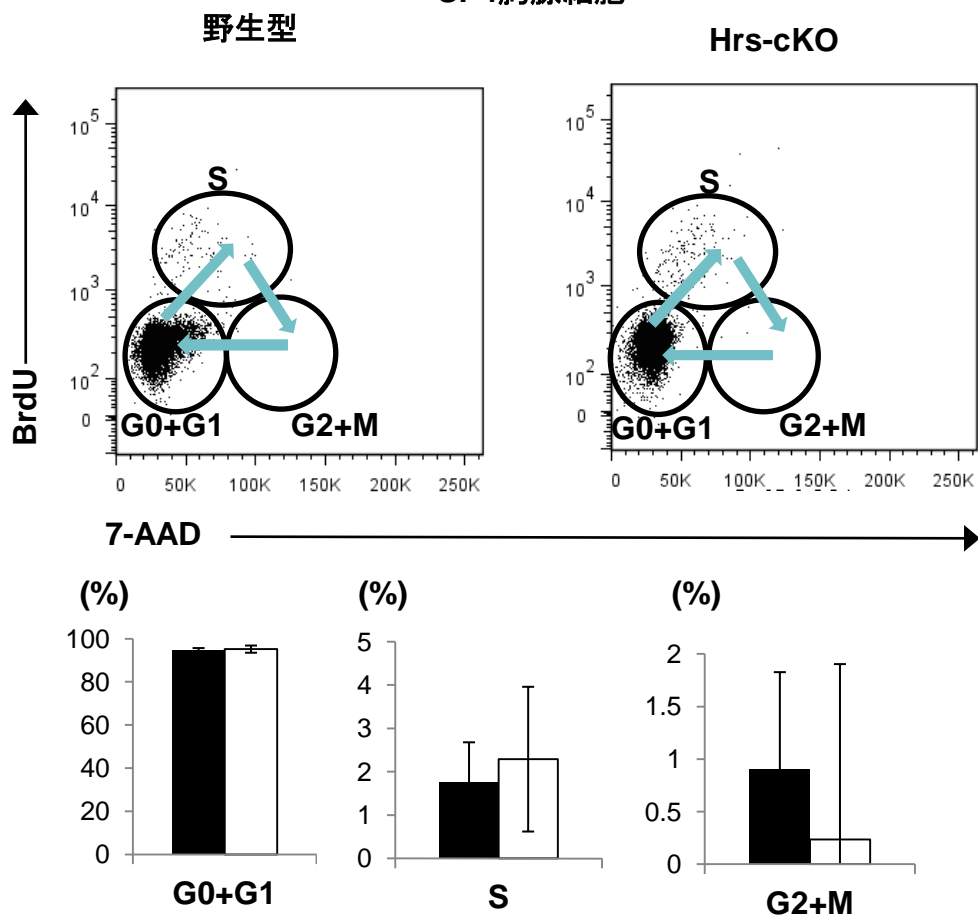
A

SP4胸腺細胞



B

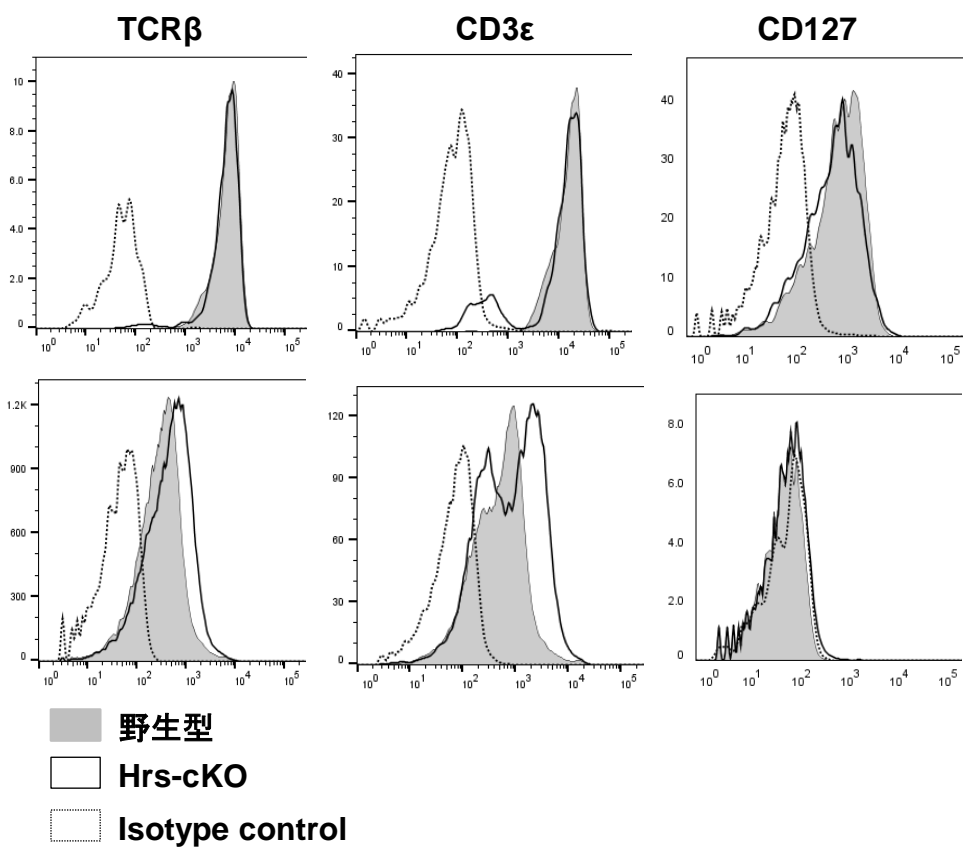
SP4胸腺細胞



C

SP4 胸腺細胞

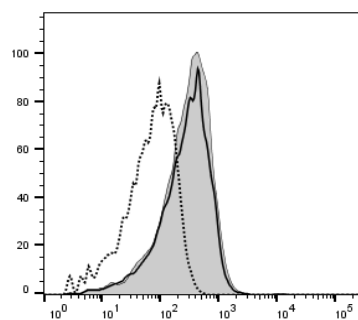
DP 胸腺細胞



D

CCR7

SP4胸腺細胞



E

野生型

Hrs-cKO

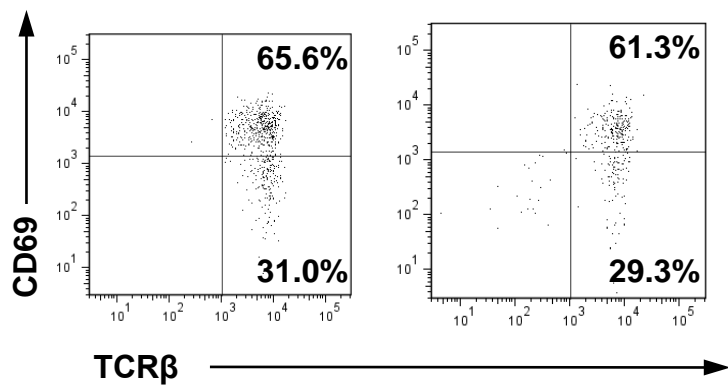
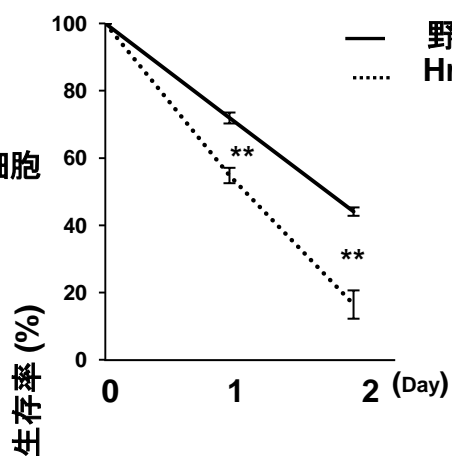


図6

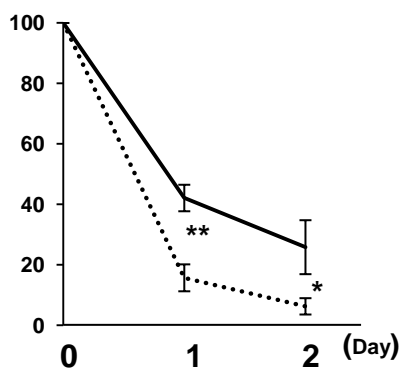
A

— 野生型
..... Hrs-cKO

SP4 胸腺細胞



DP胸腺細胞



* $P < 0.05$

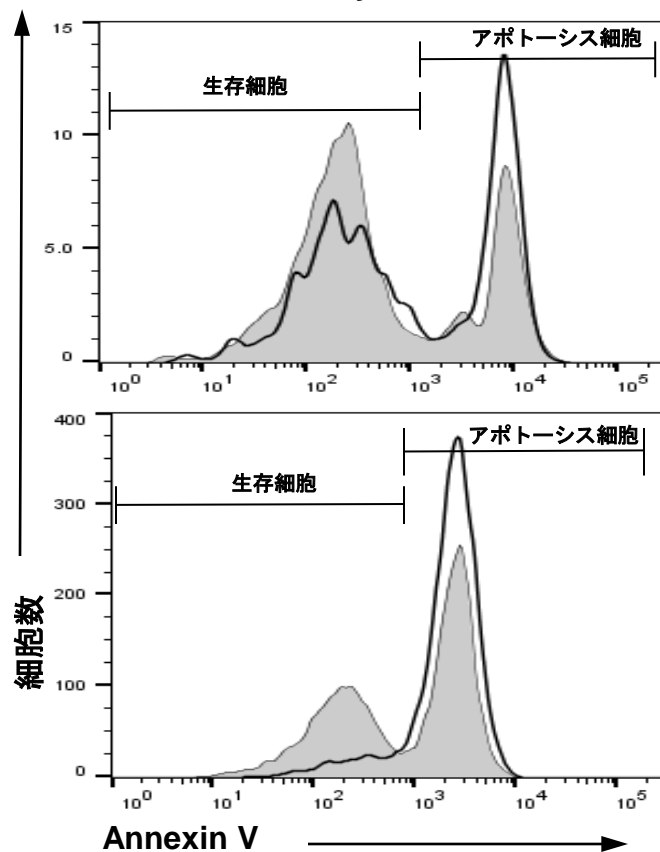
** $P < 0.01$

B

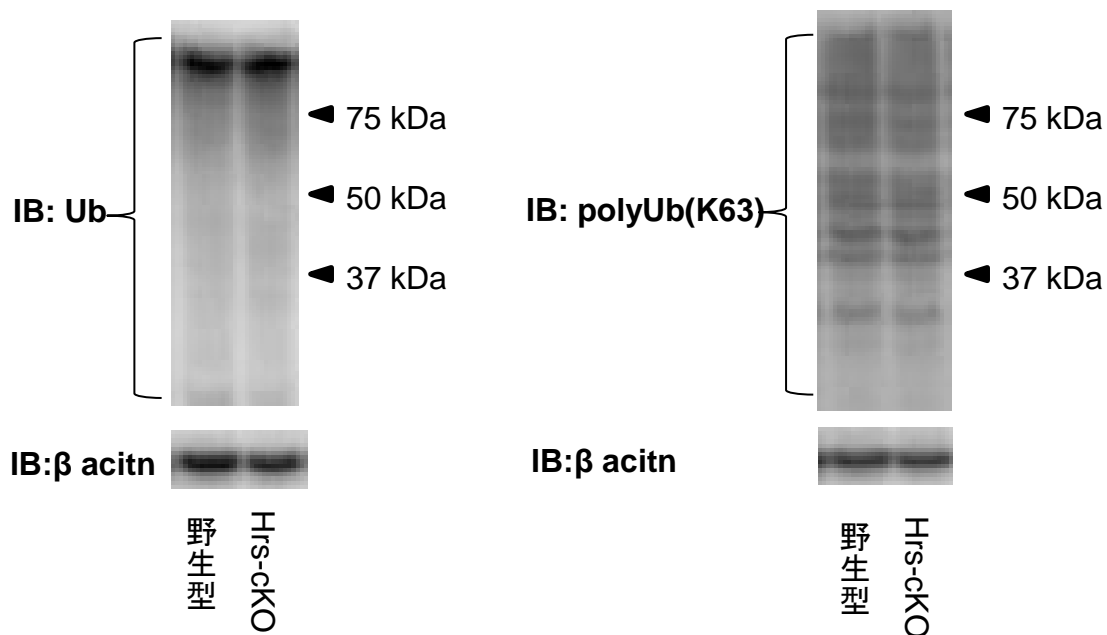
Day 1

■ 野生型

□ Hrs-cKO



A



B

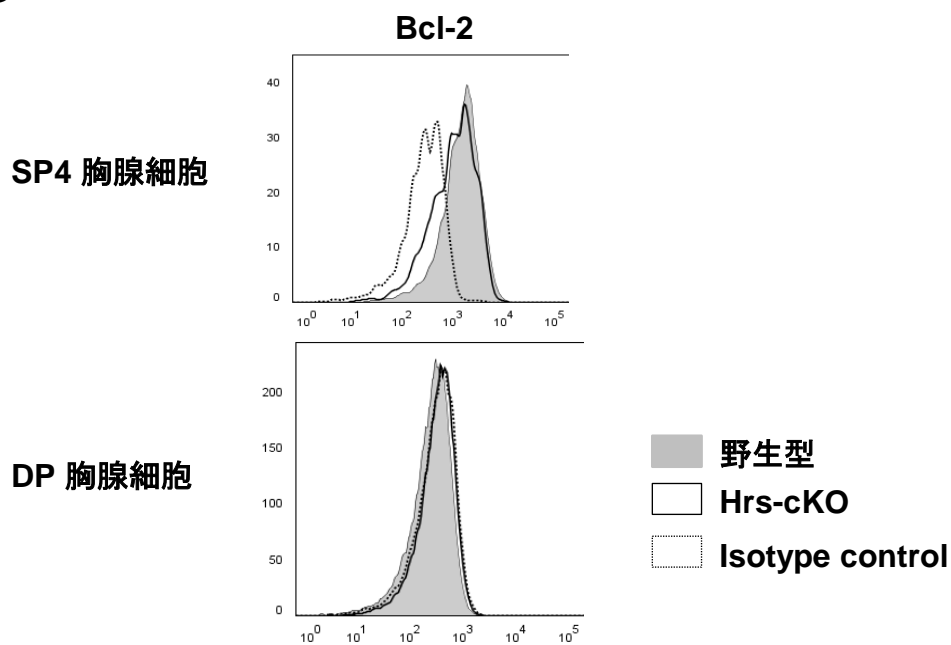
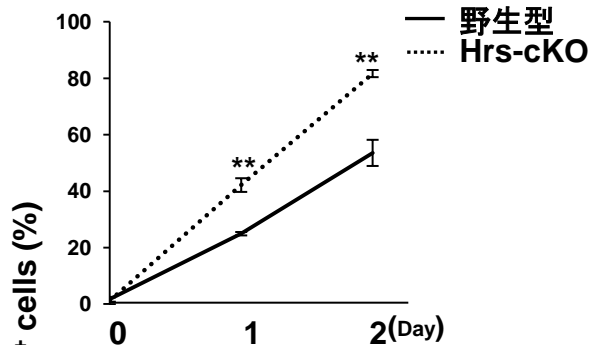


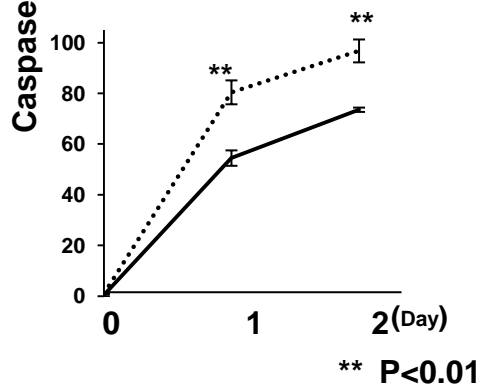
図7-2

C

SP4 胸腺細胞



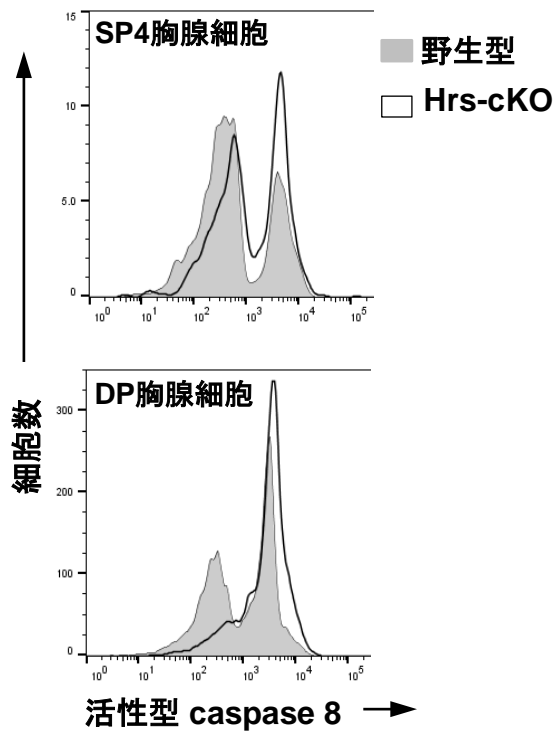
DP 胸腺細胞



** P<0.01

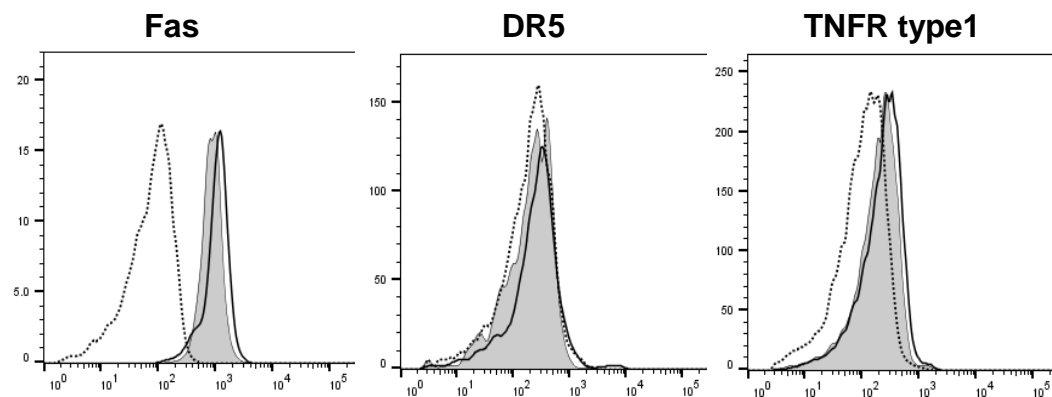
D

Day 1

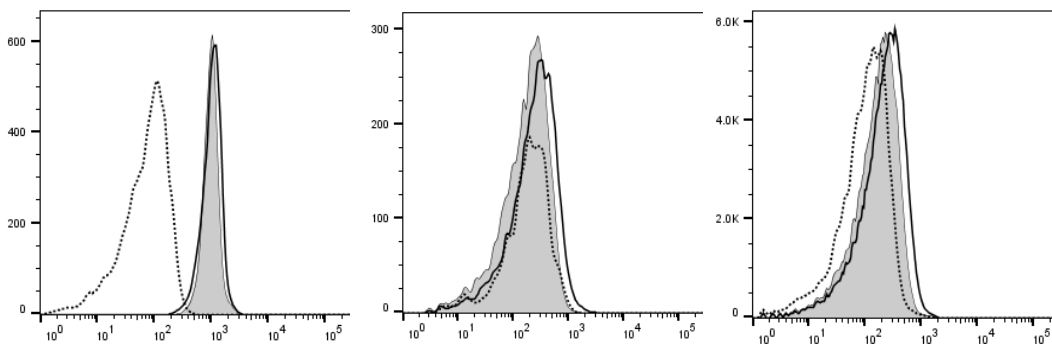


E

SP4 胸腺細胞



DP 胸腺細胞



野生型
Hrs-cKO
Isotype control

表1：ESCRT-0関連遺伝子ノックアウトマウスの表現型

欠損蛋白	欠損細胞	表現型	参考文献
Hrs	全身性	胎生致死	M Komada et al. Hrs, a FYVE finger protein localized to early endosomes, is implicated in vesicular traffic and required for ventral folding morphogenesis . Genes & Dev.13. 1999: 1975-1985
Hrs	樹状細胞	・ エクソソーム分泌低下 (※細胞分化や抗原提示能には変化無し)	K.Tamai et al. Exosome secretion of dendritic cells is regulated by Hrs, and ESCRT-0 protein. Biochem Biophys Res Commun. 2010; 399: 384-390
Hrs	神経	・ 神経系の発生異常 ・ 海馬の錐体ニューロンの細胞死	K.Tamai,M. et al :Loss of hrs in the central nervous system causes accumulation of ubiquitinated proteins and neurodegeneration. Am J Pathol 2008; 173: 1806-1817.
Hrs	B細胞	・ transitional B 細胞及び marginal zone B 細胞の減少 ・ T 細胞依存性の抗体産生の減少	T.Nagata et al. Hepatocyte growth factor regulated tyrosine kinase substrate in the peripheral development and function of B cells . Biochem Biophys Res Commun. 2014; 443: 351-356
STAM1/ STAM2	T細胞	・ 胸腺細胞減少 ・ アポトーシスの亢進	M.Yamada et al. Signal-transducing adaptor molecule STAM1 and STAM2 are required for T cell development and survival. Mol Cell Biol. 2002; 22: 8648-8658
USP8	T細胞	・ 胸腺細胞減少 ・ 大腸炎 ・ 短命	A.Dufner, A.Kisser,P.Knobeloch et al : The ubiquitin-specific protease USP8 is critical for the development and homeostasis of T cells. Nat Immunol 2015; 16: 950-960.